

Rec'd PCT/PTO 15 APR 2005

PCT/JP2004/002780

04.3.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

10/531463

REC'D 22 APR 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 2月 5日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-028965
[ST. 10/C]: [JP2004-028965]

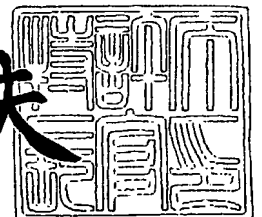
出 願 人
Applicant(s): 株式会社アウレオ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2004-3029386

【書類名】 特許願
【整理番号】 MP-1809
【提出日】 平成16年 2月 5日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都港区白金台2丁目7番地7号 株式会社アウレオ内
 【氏名】 守屋 直幸
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都港区白金台2丁目7番地7号 株式会社アウレオ内
 【氏名】 守屋 ▲祐▼生子
【特許出願人】
 【識別番号】 501257370
 【氏名又は名称】 株式会社アウレオ
【代理人】
 【識別番号】 100086689
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 松井 茂
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 002071
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0318912

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項 2】

前記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (Aureobasidium pullulans M-1) (FERM P-19213) である、請求項 1 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 3】

固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で 5~80 質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を 10~80 質量%含有する、請求項 1 又は 2 に記載の免疫賦活剤。

【請求項 4】

前記培養物は、固形分濃度が 0.5~5 質量%であり、かつ、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを 10 質量%以上含むものである、請求項 1~3 のいずれか一つに記載の免疫賦活剤。

【請求項 5】

前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) である、請求項 1~4 のいずれか一つに記載の免疫賦活剤。

【請求項 6】

前記乳酸菌は加熱殺菌されたものである、請求項 1~5 のいずれか一つに記載の免疫賦活剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】免疫賦活剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、経口摂取することにより、免疫機能を向上させることができる免疫賦活剤に関し、詳しくは、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌を培養して得られる培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有する免疫賦活剤に関する。

【背景技術】

【0002】

生体の免疫系は、外界からの細菌やウイルス等の微生物による感染や、生体内で発生する腫瘍等に対する防御機構として重要な役割を果たしている。免疫機能の低下は様々な疾病を誘発することから、疾患の予防や健康維持等の点からも免疫機能の向上を図ることは重要であると考えられる。

【0003】

従来より、免疫機能を向上させる作用、すなわち免疫賦活能を有する素材として、例えば、 β -グルカンや乳酸菌等が知られており、これらを有効成分として含む免疫賦活剤や健康食品等の開発が積極的に行われている。

【0004】

例えば、 β -グルカンを利用した免疫賦活剤として、下記特許文献1には、オウレオバシジウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) IF04466菌株の培養上清から得られる、 β -1, 3結合グルコース残基を主鎖として、これに β -1, 6結合グルコース残基の分岐鎖を多数側鎖として有する数分子量1万~500万の高分岐度 β -グルカンが、経口的に高い抗腫瘍活性及び免疫賦活活性を有し、医薬、食品添加物、飼料添加物等として有用である旨が記載されている。

【0005】

また、下記特許文献2には、 β -1, 3-1, 6グルカンの主成分とするアウレオバシジウム培養液が、各種疾病に対する医薬品として応用できる旨が記載されている。

【0006】

一方、乳酸菌を利用した免疫賦活剤として、例えば、下記特許文献3には、*Enterococcus faecalis* AD101菌株の死菌体を主成分とする免疫調整剤が開示されている。

【0007】

また、下記特許文献4には、エンテロコッカス属に属する乳酸菌および麹菌を液体培養によって培養された菌体を有効成分とすることを特徴とする免疫賦活素材が開示されている。

【0008】

更に、 β -グルカンと乳酸菌を併用したものとして、例えば、下記特許文献5には、 β -グルカンを含む素材と、乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有することを特徴とする感染抑制組成物が開示されている。

【0009】

また、下記特許文献6には、体内におけるTNFをはじめとするサイトカインの産生を促進し、その作用を増強させ、抗体産生能或いは免疫作用全体を増強することによって各種感染症や腫瘍発生の予防に役立つ、低分子量の水溶性 β -グルカンが開示されており、この β -グルカンと乳酸菌を併用することが記載されている。

【特許文献1】特開平6-340701号公報

【特許文献2】特開2002-204687号公報

【特許文献3】特開2001-48796号公報

【特許文献4】特開2003-113114号公報

【特許文献5】特開2003-40785号公報

【特許文献6】特開2001-323001号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】**【0010】**

しかしながら、上記のような従来の免疫賦活剤は、副作用が少ないものの、その有効性において満足しうるものは少なかった。

【0011】

したがって、本発明の目的は、副作用がなく、より優れた免疫賦活能を有する免疫賦活剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0012】**

上記目的を達成するため、本発明の免疫賦活剤は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有することを特徴とする。

【0013】

本発明の免疫賦活剤は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを含有することにより、これらの成分の相乗効果により、優れた免疫賦活効果が得られる。なお、 β -1, 3-1, 6-グルカンは、小腸の腸管免疫を活性化し、乳酸菌菌体は、マクロファージ、T細胞及びB細胞の活性化を促進し、これらの作用によって相乗的な免疫賦活効果がもたらされるものと考えられる。

【0014】

本発明の免疫賦活剤においては、前記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (Aureobasidium pullulans M-1) (FERM P-19213) であることが好ましい。この態様によれば、より生理活性の高い β -1, 3-1, 6-グルカンを得ることができる。

【0015】

また、固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で5~80質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を10~80質量%含有することが好ましい。

【0016】

更に、前記培養物は、固形分濃度が0.5~5質量%であり、かつ、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを10質量%以上含むものであることが好ましい。

【0017】

更にまた、前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) であることが好ましい。

【0018】

これらの態様によれば、 β -1, 3-1, 6-グルカンと乳酸菌菌体による相乗的な免疫賦活効果をより期待できる。

【0019】

更にまた、前記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。この態様によれば、加熱処理が必要な飲食品にも幅広く添加することができ、また、保存安定性が高く、飲食品や医薬品の原料として用いる場合の安全性も非常に高い免疫賦活剤を提供できる。

【発明の効果】**【0020】**

本発明の免疫賦活剤は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを含有することにより、これらの成分の相乗効果により、優れた免疫賦活効果が得られる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0021】**

本発明において、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる培養物（以下、単に培養物という。）としては、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属し、 β -1, 3-1, 6-グルカン生産能を有する菌を培養した培養液

そのもの、該培養液の濃縮液、あるいは該培養液から水分を除いた固形物等を用いることができるが、好ましくは培養液そのもの又は該培養液の濃縮液が用いられ、その場合、固形分濃度が0.5～5質量%であることが好ましく、1～3質量%であることがより好ましい。

【0022】

上記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌としては、例えば、特開昭57-149301号公報、特公平5-4063号公報、特開2002-335926号公報等に記載された菌株を用いることができるが、本発明においては、アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター寄託番号FERM P-19213) が好適に用いられる。なお、本発明において、 β -1, 3-1, 6-グルカンとは、グルコースが β -1, 3結合した主鎖から β -1, 6結合でグルコースが分岐した構造を有するものを意味する。

【0023】

上記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌の培養は、公知の方法（特開昭57-149301号公報等参照）に準じて行うことができる。すなわち、炭素源（ショ糖）0.5～5.0質量%、N源0.1質量%、その他微量物質（例えば、ビタミン類、無機質）を加えた培地（pH 5.2～6.0）に菌を接種し、温度20～30℃で2～14日間通気培養、好ましくは通気攪拌培養すればよい。 β -1, 3-1, 6-グルカンが生成されるにしたがって培養液の粘度が上昇し、粘性の高いジェル状になる。このようにして得られる培養液には、通常、0.6～1.8質量%の固形分が含まれており、該固形分中には β -1, 3-1, 6-グルカンが5～80質量%含まれている。また、 β -1, 3-1, 6-グルカン以外にも、例えば、該グルカンの作用を助ける成分であるリン、カリウム、マグネシウム、ビタミンC等の他の有用成分も含まれているので、 β -1, 3-1, 6-グルカンの有する生理活性効果を効率よく発揮できる。

【0024】

本発明においては、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを10質量%以上含む培養物が好ましく用いられ、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを20質量%以上含む培養物がより好ましく用いられる。培養物中の β -1, 3-1, 6-グルカン濃度が低すぎると、該グルカンの生理活性効果が十分に期待できない。

【0025】

なお、 β -1, 3-1, 6-グルカンの定量は、例えば次のような方法で行うことができる。すなわち、培養液にアミラーゼ、アミログルコシダーゼ、プロテアーゼ等を用いて酵素処理を施し、蛋白質や、プルラン等の α -グルカンを除き、エタノール沈殿を行う。更に、ガラスフィルターでろ過し、高分子試料を得る。このとき、単糖を含む低分子物質を除くため、80%エタノールで十分に洗浄する。洗浄した高分子試料はアセトンで更に洗浄し、硫酸を加え、加水分解を行う。加水分解後、中和し、そのろ液を採取して、グルコースオキシダーゼ法によりブドウ糖を定量し、下記数式1に基づいて計算した値をグルカン量とする。

数式1： β -グルカン (g/100g) = ブドウ糖 (g/100g) \times 0.9

【0026】

また、 β -1, 3-1, 6-グルカンの定量は、特公平3-48201号公報に記載された方法に準じて行うこともできる。すなわち、培養終了後、培養液を殺菌して、遠心分離して菌体を除去し、得られた溶液にクロロホルム/ブタノール混合液を10% (v/v) 加えて振とう (Sevage法) した後、遠心処理してクロロホルムと不溶物を除去する。この操作を2回繰り返した後、エタノール沈殿により、沈殿物を回収して蒸留水に溶解し、酵素処理により、プルランを分解し、蒸留水中で透析を行い、透析液をエタノール沈殿して、沈殿物 (β -1, 3-1, 6-グルカン) を回収して収量を求めればよい。

【0027】

本発明においては、上記のようにして得られる培養液をそのまま加熱又は加圧加熱殺菌して用いてもよく、遠心分離等により菌体を分離除去した後殺菌して用いてもよい。また

、必要に応じて濃縮したもの、更には乾燥したものをを用いることもできる。なお、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養物は、増粘安定剤等の食品添加物として使用されているものであり安全性は高い。

【0028】

一方、本発明で用いられる乳酸菌としては、食品に使用可能な乳酸菌であれば特に制限なく用いることができ、具体的には、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris)、ストレプトコッカス・ラクティス (Streptococcus lactis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium Longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) 等が例示できる。上記乳酸菌は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0029】

なお、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) は乳酸菌製剤等に用いられている乳酸菌であり、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) は、チーズ、発酵乳、ヨーグルト、乳酸菌飲料等に用いられている乳酸菌であり、ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris)、ストレプトコッカス・ラクティス (Streptococcus lactis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) は、チーズ、ヨーグルト等に用いられている乳酸菌であり、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium Longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) は発酵乳等に用いられている乳酸菌である。したがって、これらの乳酸菌は、いずれも当業者が容易に入手できるものである。

【0030】

本発明においては、上記の乳酸菌の中でも、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) が特に好ましく用いられる。エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) は、強い免疫賦活活性を有していることが知られており、上記培養物と併用することにより、 β -1, 3-1, 6-グルカンとの相乗的な免疫賦活効果が期待できる。

【0031】

本発明において、上記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。これにより、加熱処理が必要な飲食品にも幅広く添加することができ、また、保存安定性が高く、飲食品や医薬品の原料として用いる場合の安全性も非常に高くなる。

【0032】

上記乳酸菌の培養は常法にしたがって行えばよく、例えば、上記乳酸菌を常法にしたがって培養して得られた培養物から、濾過、遠心分離等の方法により菌体を回収し、水洗後、水等に懸濁して80～115℃、30分～3秒間加熱処理すればよい。加熱殺菌した乳酸菌は、必要に応じて濃縮、乾燥してから用いてもよい。

【0033】

本発明の免疫賦活剤は、例えば、上記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養液を殺菌したものに、上記乳酸菌の加熱殺菌菌体を混合して分散させることにより得ることができる。また、必要に応じて、錠剤、カプセル剤、粉末、顆粒、液状、ペースト状、ゼリー状等の各種形態とすることもできる。

【0034】

本発明の免疫賦活剤は、固形分中に、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で5～80質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を10～80質量%含有することが好ましく、更には上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で25～70質量%含有し、

かつ上記乳酸菌菌体を20~70質量%含有することがより好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で30~60質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を30~60質量%含有することが最も好ましい。また、上記基本的成分以外に、香料、甘味料、ビタミン類、ミネラル類、オリゴ糖、増粘多糖類、デキストリン、植物エキス、その他の植物成分等を適宜含むことができる。

【0035】

本発明の免疫賦活剤の有効摂取量は、成人1日当たり、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.02~0.50g、かつ上記乳酸菌菌体を0.10~0.90gであり、好ましくは、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.06~0.40g、かつ上記乳酸菌菌体を0.15~0.45gである。

【0036】

また、本発明の免疫賦活剤は、例えば、清涼飲料、ゼリー飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スープ、味噌汁、冷凍食品、その他の加工食品等の各種飲食品に配合することもできる。上記各飲食品における本免疫賦活剤の添加量は、上記の成人1日当たりの有効摂取量に基づいて設定すればよいが、通常、 β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.02~0.50質量%が好ましく、0.06~0.40質量%がより好ましい。また、乳酸菌菌体に関しては、0.10~0.90質量%が好ましく、0.15~0.45質量%がより好ましい。なお、添加方法は特に制限はなく、各飲食品に用いられる他の原料と一緒に最初から添加することもできる。

【実施例1】

【0037】

(1) アウレオバシジウムの培養

アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1) (FERM P-19213) の前培養液を、ショ糖1%、アスコルビン酸0.2%、米糠0.2%を含む液体培地 (pH 5.3) に適量接種して、25℃、2日間、通気攪拌培養を行った。培養終了後、この培養液を121℃、15分間殺菌した。この培養液は固形分1質量%であり、該固形分中に35質量%の β -1, 3-1, 6-グルカンを含んでいた。

【0038】

(2) エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) の培養

エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*, IF0 16803) を、ロゴサ培地で37℃、24時間培養した前培養液を、酵母エキス4%、ポリペプトン3%、乳糖10%を含む液体培地に適量接種し、pHスタットを用いてpH 6.8~7.0に苛性ソーダ水溶液で調整しながら37℃、22~24時間中和培養を行った。

【0039】

培養終了後、連続遠心機で菌体を分離、回収した後、水を加えて元の液量まで希釈して再度連続遠心機で菌体を分離、回収した。この操作を合計4回繰り返して菌体を洗浄した。次いで、洗浄した菌体を適量の水に懸濁し、100℃、30分間殺菌した後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥して加熱殺菌菌体粉末 (5×10^{12} cfu/g) を調製した。

【0040】

(3) 免疫賦活剤の調製

上記(1)で得られたアウレオバシジウム培養物1Lに、上記(2)で得られた乳酸菌の加熱殺菌菌体10gを加えて、均一に混合して免疫賦活剤を得た。

【実施例2】

【0041】

実施例1で得られた免疫賦活剤を用いて、以下の方法により、初期感染防御効果について調べた。

【0042】

(1) 生存率の測定

1週間予備飼育を行ったBALB/cマウス (7週齢、雌) 28匹 (日本エスエルシー (株))

より購入)を4群(各群7匹)に分け、各群に下記の被験物質をマウス1匹当たり200 μ lずつ、1日1回試験期間中連続経口投与した。

【0043】

試験群: 上記免疫賦活剤

比較群1: アウレオバシジウム培養液(実施例1(1)で得られたもの)

比較群2: 乳酸菌の加熱殺菌菌体(実施例1(2)で得られたもの)をPBSに懸濁したもの(1g菌体/100ml)

対照群: PBS

上記各被験物質を1週間連続経口投与した各群のマウスの尾静脈内に、細胞内寄生性細菌であるリステリア菌(*Listeria monocytogenes*, EGD株)を 5.4×10^4 cfu/200 μ l/マウス(2 \times LD₅₀)となるように接種し、その後2週間経過観察を行い、各群のマウスの生存率及び平均生存期間を求めた。

【0044】

その結果を表1及び図1～3に示す。なお、試験期間中、水及び飼料(商品名「粉末飼料CRF-1」、オリエンタル酵母株式会社製)は自由摂取とした。

【0045】

【表1】

群	生存率	平均生存日数
試験群	85.7% (6/7)	12.7日
比較群1	71.4% (5/7)	11.5日
比較群2	28.6% (2/7)	6.4日
対照群	0% (0/7)	3.0日

【0046】

表1及び図1～3から分かるように、試験群においては、1例が死亡(菌接種後6日目)したのみであり、試験終了時の生存率は85.7%であったが、対照群においては、全例が死亡(細菌接種4日目)し、試験終了時の生存率は0%であった。また、比較群1においては、2例が死亡(菌接種6日目に1例、7日目に1例)し、試験終了時の生存率は71.4%であった。また、比較群2においては、5例が死亡(菌接種4日目に3例、5日目に2例)し、試験終了時の生存率は28.6%であった。試験群と他の群間の有意差をMann-WhitneyのU検定を用いて検定したところ、試験群は対照群及び比較群2に対して危険率1%未満で有意差が認められた。

【0047】

また、平均生存期間に関しては、試験群においては12.7日であったのに対し、対照群が3.0日、比較群1が11.5日、比較群2が6.4日であった。試験群と他の群間の有意差をMann-WhitneyのU検定を用いて検定したところ、試験群は対照群及び比較群2に対して危険率1%未満で有意差が認められた。

【0048】

この結果から、本免疫賦活剤を経口摂取することにより、細菌感染における宿主の感染抵抗性を亢進させることが示唆された。

【0049】

(2) 臓器内菌数測定

上記(1)において、リステリア菌に対する感染抵抗性に本免疫賦活剤が作用をしていることが示唆されたため、菌排除の指標となる臓器内菌数の経時的変化について解析を行った。

【0050】

1週間予備飼育を行ったBALB/cマウス(7週齢、雌)を1群当たり30匹使用し、上記と同様にして各被験物質を投与した。そして、上記各被験物質を1週間連続経口投与した各群のマウスの尾静脈内に、細胞内寄生性細菌であるリステリア菌(*Listeria monocytogene*

s、EGD株)を 2.7×10^3 cfu/200 μ l/マウス(1/10 \times LD₅₀)となるように接種し、細菌接種後1日目、3日目、5日目、7日目及び10日目に逐日的に5匹ずつ各群のマウスを屠殺し、脾臓を回収した。

【0051】

回収した脾臓をブレンダーにてすり潰してPBS 5ml中に再懸濁し、これを原液とした。この原液を10倍階段希釈法にて希釈し、原液及び各希釈系列液より100 μ l取り、TSA培地上に塗抹し37℃孵卵器にて16時間培養した。TSA培地上に発育した細菌集落数を測定し、臓器内菌数を算出した。臓器内菌数は、各群毎に平均値及び標準誤差を算出した。その結果を表2及び図4に示す。

【0052】

【表2】

群	リステリア菌接種後の経過日数				
	1日	3日	5日	7日	10日
試験群	$6.88 \pm 8.18 \times 10^4$	$9.79 \pm 7.76 \times 10^4$	$2.86 \pm 1.45 \times 10^4$	$7.24 \pm 8.78 \times 10^2$	$2.76 \pm 2.54 \times 10^1$
比較群1	$5.66 \pm 1.77 \times 10^4$	$1.20 \pm 1.13 \times 10^6$	$3.83 \pm 2.76 \times 10^4$	$1.36 \pm 1.87 \times 10^3$	検出限界未満
比較群2	$7.06 \pm 0.30 \times 10^4$	$7.12 \pm 4.06 \times 10^5$	$2.00 \pm 1.56 \times 10^4$	$9.75 \pm 14.9 \times 10^2$	検出限界未満
対照群	$4.37 \pm 7.47 \times 10^3$	$1.00 \pm 1.62 \times 10^7$	$1.14 \pm 0.85 \times 10^5$	$1.17 \pm 2.36 \times 10^4$	$3.75 \pm 7.50 \times 10^4$

【0053】

表2から分かるように、対照群では、細菌接種3日目に脾臓内の細菌数がピークとなり、その後は徐々に減少し菌接種10日目に検出限界付近(3.75 ± 7.5 CFU/脾臓)となった。一方、試験群においては、菌接種後1日目より菌の増加を認めたが、菌接種3日目は1日目とはほぼ同等の菌数を示し、その後減少し菌接種10日目では 27 ± 25 CFU/脾臓となった。比較群1及び比較群2では、菌接種後1日目より菌の増加を認め、菌接種3日目に脾臓内細菌数のピークを認め、その後徐々に菌は減少し、菌接種10日目には検出限界未満(<3.33 CFU/脾臓)となった。

【0054】

この結果から、本免疫賦活剤は感染早期での免疫機構に作用しており、感染抵抗性の亢進は、成熟T細胞による攻撃性の強い免疫機構よりも未熟型T細胞もしくは貪食細胞による非特異的免疫機構により行われている可能性が推測された。

【0055】

(3) 細胞表面分子の解析

上記(1)、(2)において、生存率、生存期間及び臓器内菌数に差異が認められたため、リステリア菌に対する感染抵抗性に関与する生体側の細胞に関してフローサイトメータによる解析を行った。

【0056】

上記(2)の臓器内菌数測定と同時に腸間膜リンパ節(MLN)を回収した。回収したMLNをスライドガラスにてすり潰し、ステンレスメッシュにて余分な組織片を除去した後、リンパ球を 1×10^6 /mlとなるようにFACS用Hank's液に再懸濁した。下記(a)～(d)に示す4種類の染色パターンにてリンパ球を染色し、フローサイトメータ(Epics-XL; Beckman Coulter)を用いて細胞(T細胞中心)表面分子の解析を行った。その結果を表3及び図5に示す。

(a) Cy-chrome(Cy)標識抗CD3mAb(T細胞固有認識マーカー)/FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ mAb(T細胞型別認識マーカー)/PE標識抗CD4mAb/biotin標識抗TCR $\gamma\delta$ (T細胞型別認識マーカー)mAb

(b) Cy標識抗CD3mAb/FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ mAb/PE標識抗CD4mAb/biotin標識抗CD69mAb(早期活性化マーカー)

(c) Cy標識抗CD3mAb/FITC標識抗TCR α β mAb/PE標識抗CD4mAb/biotin標識抗CD25mAb (IL-2R α ; 活性化マーカー)

(d) Cy標識抗CD3mAb/FITC標識抗TCR α β mAb/PE標識抗CD122mAb (IL-2R β ; 活性化マーカー) /biotin標識抗CD4mAb

【0057】

【表3】

群 0	CD25/CD122/CD69発現率(%) リステリア菌接種後の経過日数					
	日	1日	3日	5日	7日	10日
試験群	20/20/20	21/20/20	24/23/35	20/22/20	24/20/20	19/20/20
比較群1	20/20/20	20/22/20	21/22/33	21/20/20	20/22/20	20/20/21
比較群2	20/20/20	20/20/20	24/20/38	20/23/20	23/19/20	20/18/20
対照群	20/20/21	20/20/19	22/23/28	21/20/20	20/20/21	20/22/20

【0058】

表3及び図5に示されるように、試験群、比較群1、2は、対照群に比べてCD4陽性 α β 型T細胞の増加が認められた。特に、試験群においては、比較群1、2よりも増加の割合が多かった。なお、菌感染3日後においては、いずれの群もほぼ同様の割合を示した。一方、CD4陽性細胞中の活性化マーカーに関しては、CD25分子(IL-2R α)、CD122分子(IL-2R β)及びCD69分子(早期活性化マーカー)いずれも各群を問わずほぼ同等の発現程度であった。

【0059】

この結果から、試験群では感染前と感染後もCD4陽性 α β 型T細胞の著しい変化は認められなかったため、本免疫賦活剤による感染抵抗性の亢進は、分化の低い細胞集団の機能亢進によるものと推測された。

【0060】

なお、血液中のサイトカインに関して、市販のマウスインターフェロン γ (IFN- γ)測定キット(米国 ゲンザイム社製)を用いて測定したところ、表4に示すように、試験群では感染3日目にIFN- γ 量が高値を示した。CD4陽性 α β 型T細胞の変化は認められなかったことより、IFN- γ を産生している細胞はマクロファージの可能性が考えられた。

【0061】

【表4】

群 0	IFN- γ 産生量(units/ml) リステリア菌接種後の経過日数					
	日	1日	3日	5日	7日	10日
試験群	20	100	450	300	140	80
比較群1	20	120	240	300	260	100
比較群2	20	140	360	320	140	100
対照群	20	60	80	140	240	160

【産業上の利用可能性】

【0062】

本発明の免疫賦活剤は食品由来の成分を有効成分としているので安全性が高く、医薬品としてだけでなく、健康食品素材としても利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】リステリア菌摂取後の生存率と経過日数との関係を示す図表である。

【図2】リステリア菌摂取後の生存率に及ぼす被験物質の影響を示す図表である。

【図3】リステリア菌摂取後の平均生存日数と被験物質との関係を示す図表である。

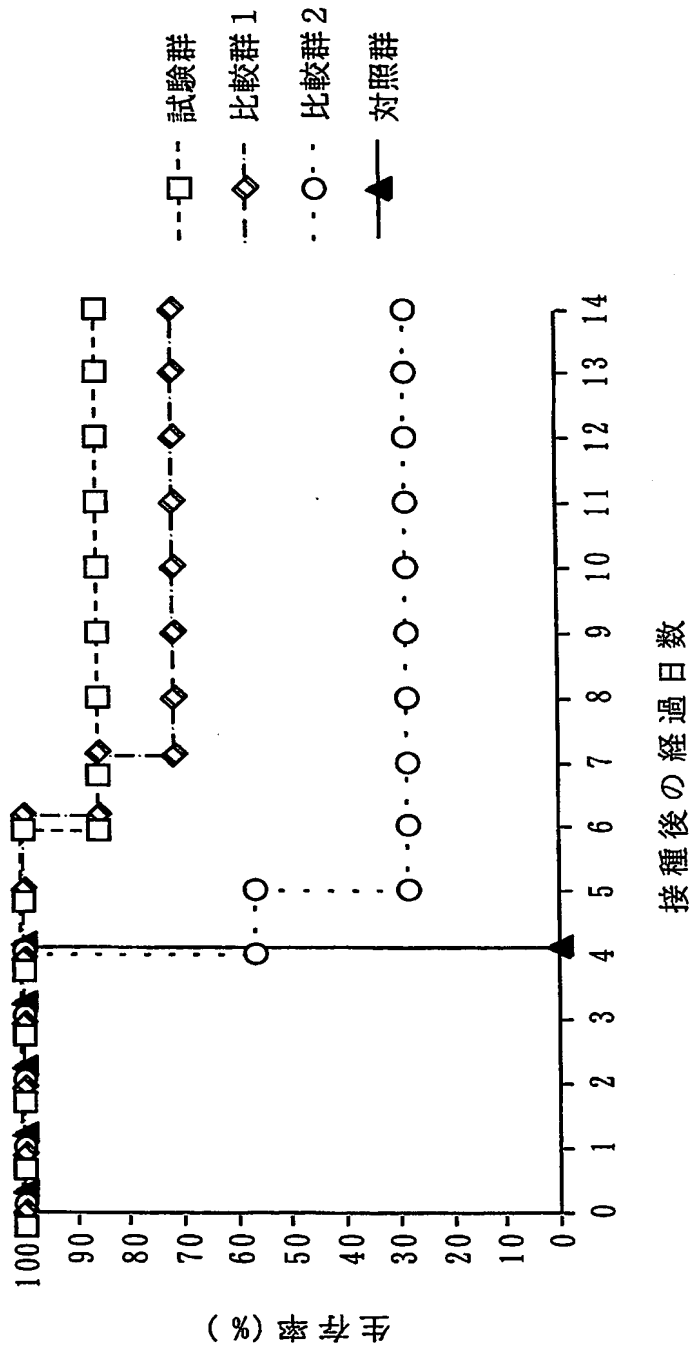
【図4】リステリア菌摂取後の脾臓内菌数の経時的変化に及ぼす被験物質の影響を示す図表である。

す図表である。

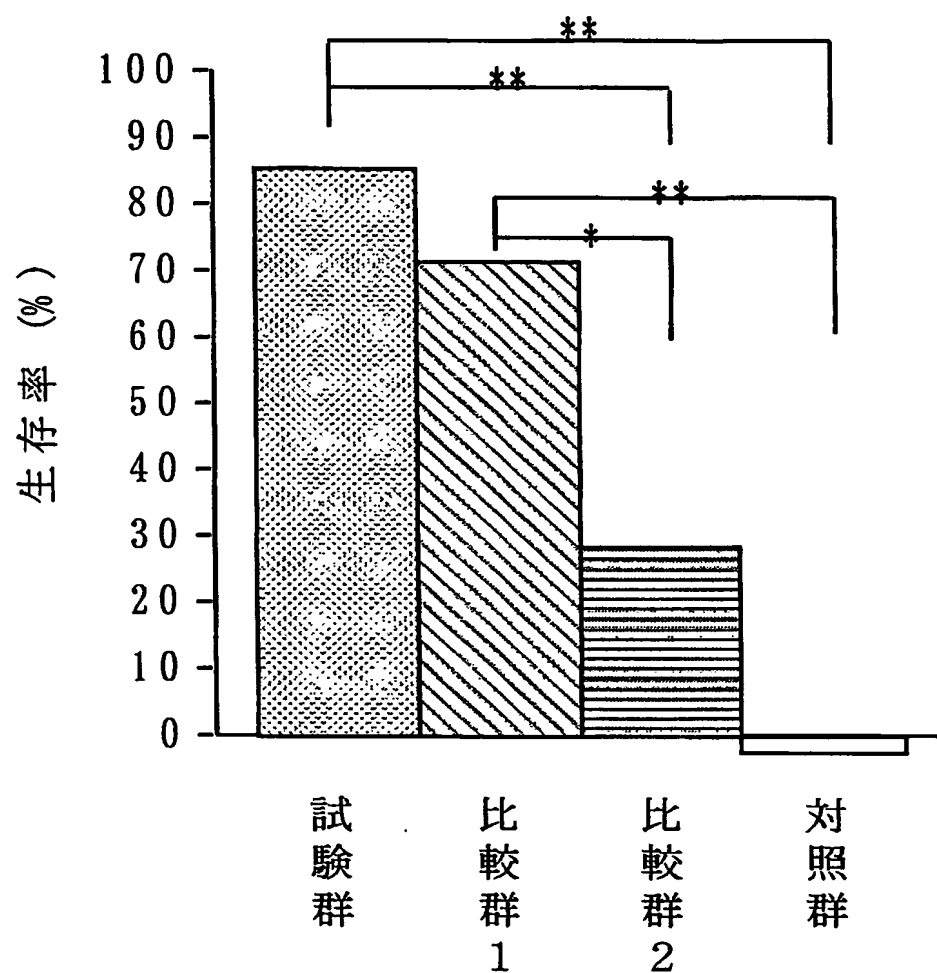
【図 5】 リステリア菌摂取後、フローサイトメータを用いて細胞表面分子の解析を行った結果を示す図表である。

【書類名】図面

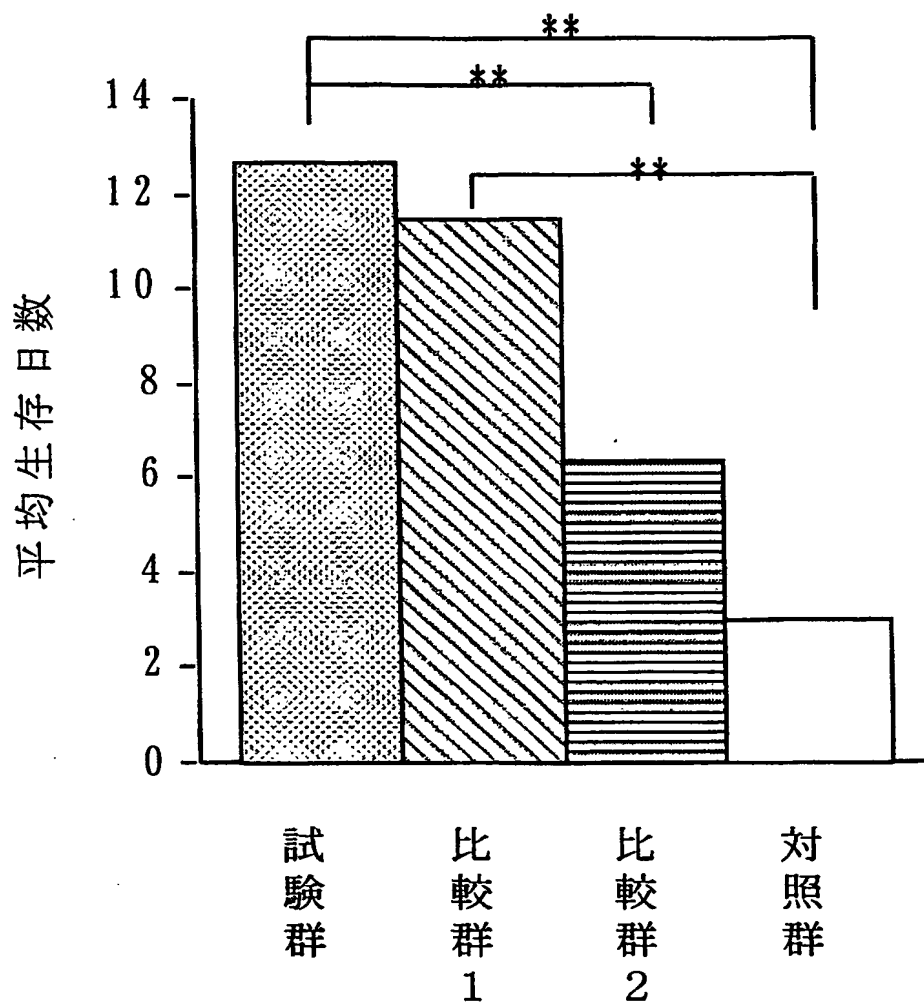
【図1】



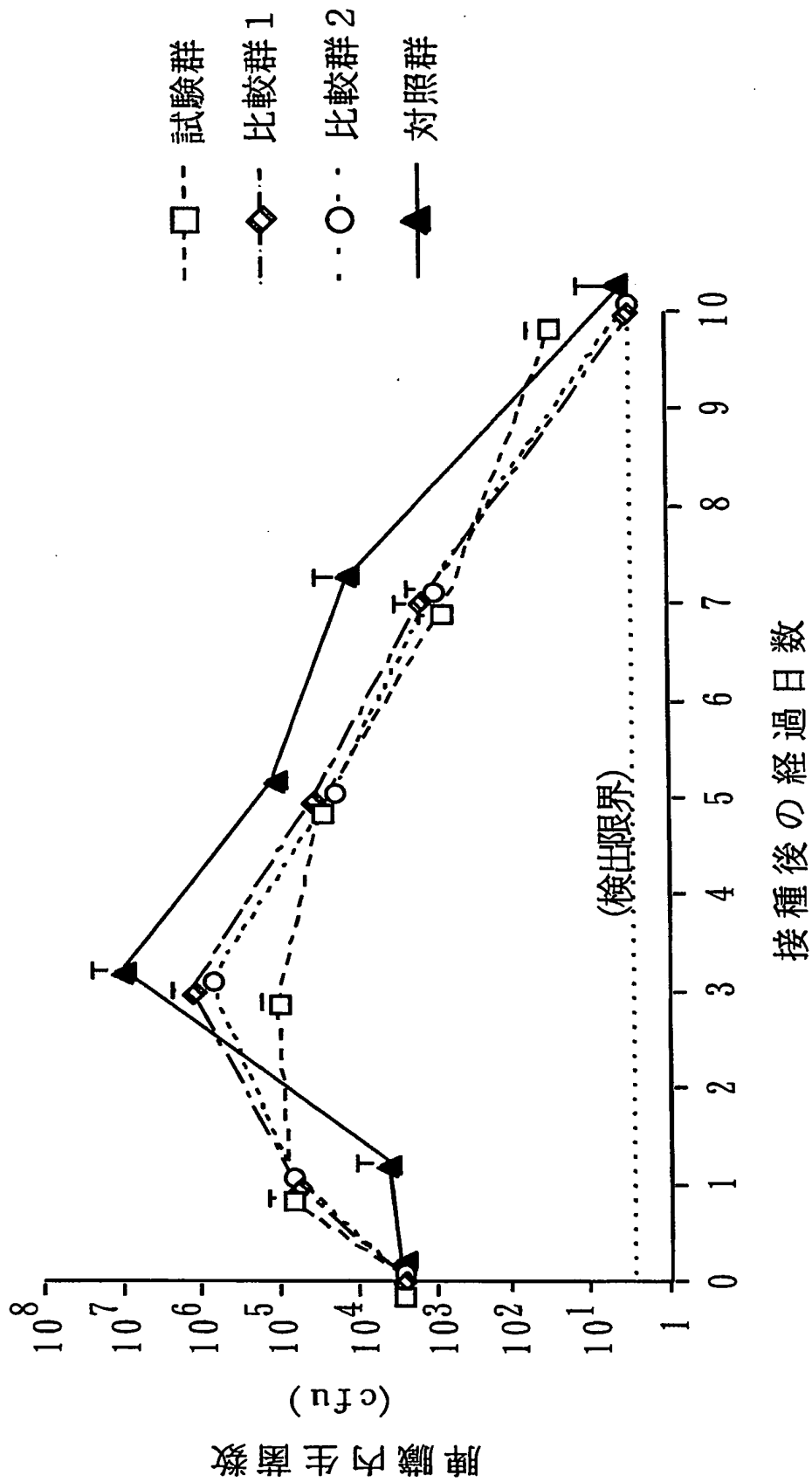
【図 2】



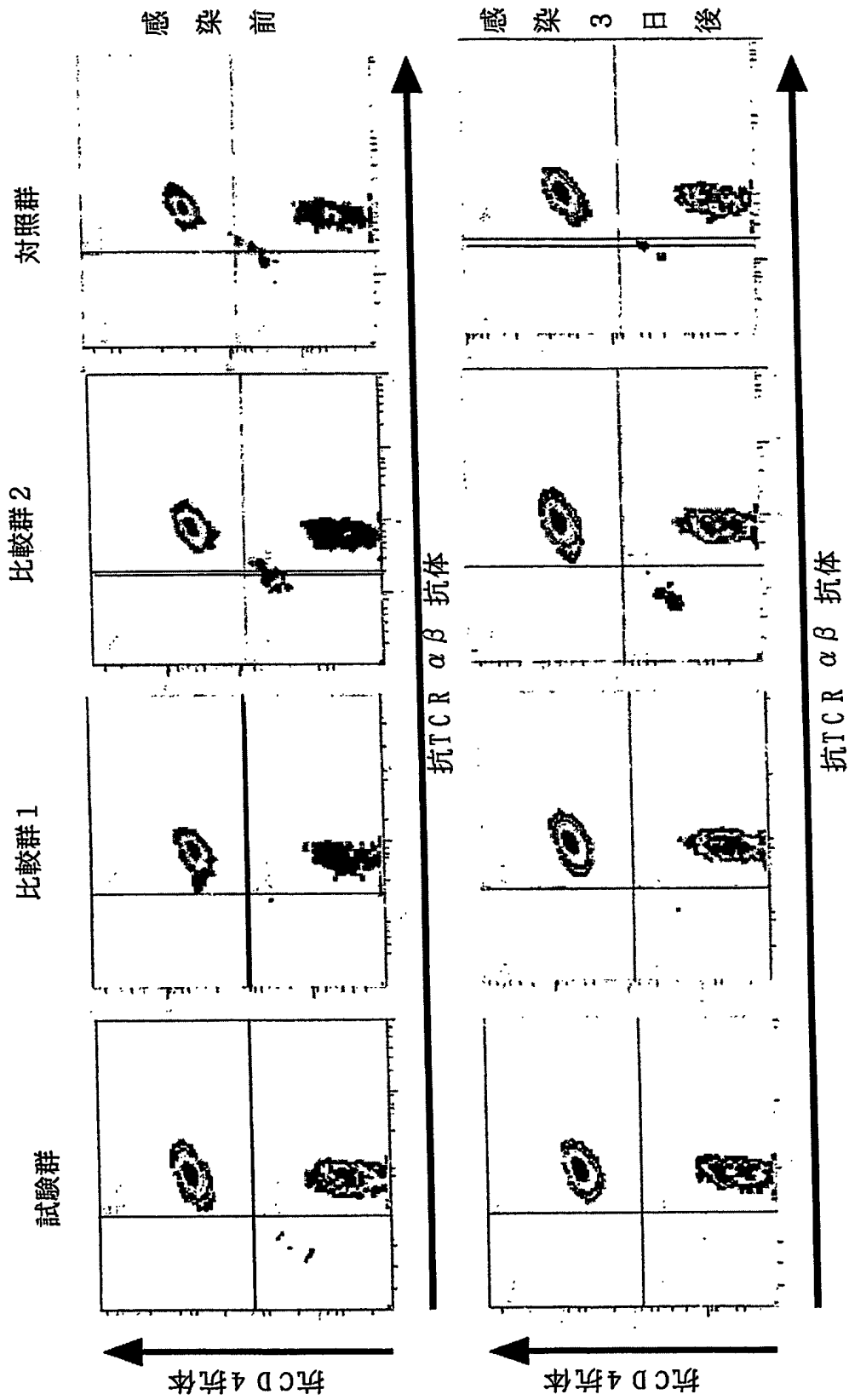
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 副作用がなく、より優れた免疫賦活能を有する免疫賦活剤を提供する。

【解決手段】 アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として免疫賦活剤に含有させる。前記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (Aureobasidium pullulans M-1) (FERM P-19213) であることが好ましい。前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) であることがこのましく、加熱殺菌されたものであることが好ましい。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 2 8 9 6 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 2 5 7 3 7 0]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 6 月 2 7 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区白金台二丁目 7 番 7 号

氏 名 株式会社アウレオ